动 物 学 研 究 2007, Jun. 28 (3): 279 - 285 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

处于性腺不同发育阶段斜带石斑鱼垂体的EST表达差异分析

李创举[1,2], 周 莉[1], 姚 波[1], 夏 伟[1], 李 志[1], 汪 洋[1], 桂建芳[1,*]

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 斜带石斑鱼是重要的海产经济鱼类, 在其个体发育过程中存在先雌后雄的天然性反转现象。垂体是调节生长和生殖等生理过程的重要内分泌器官。构建了斜带石斑鱼分别处于卵巢发育起始和性反转后期的垂体SMART cDNA的质粒文库, 并通过测序分别筛选到232个和258个表达序列标签(expressed sequence tags, EST)。将所得EST与GenBank数据库中的序列进行比对, 结果表明, 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体EST中, 激素所占比例均为最高, 分别为40.5%和34.9%。进一步比较分析了这两个性腺发育时期斜带石斑鱼垂体EST中各种激素相对表达丰度, 表明生长/催乳激素家族(GH、PRL和SL)和阿黑皮素原(POMC)表达水平下降; 促性腺激素α亚基(GTHα)表达水平急剧上升, 促滤泡激素β亚基(FSHβ)、促黄体激素β亚基(LHβ)表达水平上升。

关键词: 斜带石斑鱼; 性反转; 垂体; EST; 激素
中图分类号: Q959.483; Q57; Q785 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2007)03-0279-07

Differential Analysis of Expressed Sequence Tags from SMART cDNA Plasmid Libraries of the Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) at Two Different Gonadal Development Stages

LI Chuang-ju[1,2], ZHOU Li[1], YAO Bo[1], XIA Wei[1], LI Zhi[1], WANG Yang[1], GUI Jian-fang[1,*]

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, is an important marine aquaculture fish and has been cultured in China and Southeast Asian countries. However, large-scale aquaculture of the grouper has been hindered by the rarity of natural males, because it is a protogynous hermaphroditic fish and sex inversion rarely occurs in captive stocks. In teleost fishes, the pituitary plays significant roles in many physiological functions, such as growth and reproduction. In this study, the SMART cDNA plasmid libraries of the pituitaries from orange-spotted groupers, at the early stage of ovary development and the late stage of sex inversion, were constructed. Two hundred and thirty-two and 258 ESTs were obtained from the two pituitary plasmid libraries respectively. Among the two groups of ESTs, the genes homologous to hormones were the most numerous in both groups, accounting for 40.5% and 34.9% of all ESTs respectively. Compared with the level of expression of hormones in the pituitary at the early stage of ovary development, the expression levels of growth hormone (GH), prolactin (PRL), somatolactin (SL) and proopiomelanocortin (POMC) were reduced, and the go-

* 收稿日期: 2006-11-20; 接受日期: 2007-02-12
基金项目: 国家"973"计划项目(2004CB117401); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-020)资助项目
* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jfgui@ihb.ac.cn, Fax: +86-27-68780707
第一作者简介: 李创举, 男, 博士研究生, 主要从事鱼类发育遗传学研究。

nadotropin common α subunit (GTHα), follicle-stimulating hormone β subunit (FSHβ) and luteinizing hormone β subunit (LHβ) were increased at the late stage of sex inversion.

Key words: Grouper; Sex inversion; Pituitary; EST; Hormone

表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 技术是指通过随机选取 cDNA 文库中的阳性克隆进行单方向测序，从而获取定义特定组织在特定时期表达基因的一段序列，以分析基因时空表达特征 (Rudd, 2003)。随着分子生物学和生物信息学的发展，EST 在基因鉴定、分子标记和基因作图等方面起着越来越重要的作用 (Liu et al, 1999, 2001; He et al, 2003)。目前，不仅在多种模式鱼中，如斑马鱼 (*Danio rerio*) (Gong, 1999)、青鳉 (*Oryzias latipes*) (Hirono & Aoki, 1997)、黑青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*) (Jaillon et al, 2004)，而且在许多养殖鱼类中都开展了 EST 鉴定工作，譬如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) (Inoue et al, 1997)、沟鲶 (*Ictalurus punctatus*) (Karsi et al, 1998, 2002; Ju et al, 2000; Kim et al, 2000; Kocabas et al, 2002)、冬比目鱼 (*Pleuronectes americanus*) (Douglas et al, 1999)、鲑鱼 (*Salmo salar*) (Davey et al, 2001; Martin et al, 2002)、真赤鲷 (*Pagrus major*) (Chen et al, 2004)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) (Shiue et al, 2004)、鲤 (*Cyprinus carpio*) (Kono et al, 2004)、金头鲷 (*Sparus aurata*) (Sarropoulou et al, 2005) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (Zhou et al, 2006)。

斜带石斑鱼为海洋珊瑚礁鱼类，属鮨科 (Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*)，是名贵的海水鱼类，同时也是人工繁殖与育苗技术难度最大的海产鱼类之一。这是由于在其个体发育过程中存在先雌后雄的天然性反转现象，雄性亲鱼的难以获得及雌、雄亲鱼的不同步成熟，导致人工繁殖和育苗困难重重。尽管已经进行了一些繁殖生物学研究以及运用激素诱导石斑鱼性反转的实验 (Fan et al, 1992)，但主要集中于性腺组织学的研究 (Lee et al, 1998; Yeh et al, 2003b)，对性反转的分子机制知之甚少。揭示石斑鱼性反转的分子机制，发展生殖调控的高新技术，是解决制约石斑鱼养殖业发展瓶颈的关键之一 (Lin, 2003)。因此，多家实验室开始开展了石斑鱼生长和生殖等内分泌调控分子机制的初步研究 (Yao et al, 2003, 2007; Jia et al, 2004a, b; Wang et al, 2004; Zhang et al, 2004, 2007; Chen et al, 2005; Li et al, 2005; Li et al, 2005; Ye et al, 2005; Zhou et al, 2005, 2006; Ji et al, 2006a, b; Ko et al, 2007; Pedroso et al, 2006; Cui et al, 2007; Xia et al, 2007)。

“下丘脑－垂体－靶器官”是调节鱼类生长和生殖等生理活动的重要内分泌轴。下丘脑通过分泌生长激素释放激素、促性腺激素释放激素等释放或抑制因子，调节垂体 GH、GTH 等各种激素的分泌，后者再通过外周血液循环，作用于肝脏、性腺等相应靶器官，影响靶器官的内分泌和外分泌，从而调控鱼类生理活动 (Chappel et al, 1983; Xiao & Lin, 1999)。近几年来，我们通过构建处于不同性腺发育时期斜带石斑鱼下丘脑、垂体和性腺 SMART cDNA 质粒文库，筛选和鉴定了一批调控石斑鱼生长和生殖的重要功能基因，譬如 *EcApo-14* (Zhou et al, 2005)、*EcSL* (Jia et al, 2004)、*EcTSHβ* (Wang et al, 2004)、*EcGTHα*、*EcFSHβ*、*EcLHβ* (Li et al, 2005)、*EcSox3* (Yao et al, 2003, 2007)、*EcOC2* (Ji et al, 2006b)、*EcDMRT1* (Xia et al, 2007) 等。在硬骨鱼类中，垂体同样在生长和生殖调控中起着承上启下的枢纽作用。因此，在本研究中，我们首先分别构建了处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体的 SMART cDNA 质粒文库，从中筛选到一批 EST，并对这两个特定发育时期斜带石斑鱼垂体中各种激素的相对表达量进行比较，以期获得在石斑鱼性反转过程中起重要作用的候选基因。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

分别取 1 年和 7 年的斜带石斑鱼各 1 尾，麻醉放血，开颅取出垂体。性腺组织切片观察表明，它们分别处于卵巢发育起始阶段和性反转后期阶段。垂体总 RNA 用 SV Total RNA Isolation System (Promega) 试剂盒提取，具体步骤参照操作手册。将抽提的 RNA 于真空冻干机中超低温冻干后，溶解于 20—30 μL 水中，用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (Eppendorf) A260: A280 nm 比值确定总 RNA 的浓度和质量。

1.2 SMART cDNA 合成

取垂体总 RNA 各 100 ng 进行 SMART（switching mechanism at 5′end of RNA transcript）cDNA 合成，具体操作按照 SMART cDNA Library Construction Kit（Clontech）操作手册并加以改进的方法进行（Xie et al，2001；Zhou et al，2006；Jia et al，2004b）。合成所用的引物序列分别为：① CDS 引物（10 μmol/L），5′ AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT（30）N-1N23′；② Smart Ⅱ寡核苷酸（10 μmol/L），5′ AAGCAGTGGTAACAAC2GCAGAGTACGCGGG 3′，③ PCR 引物（10 μmol/L），5′ AAGCAG TGGTAA-CAACGCAGAGT 3′。首先按文库构建方法合成第一链 cDNA：加入 CDS 引物和 Smart Ⅱ寡核苷酸各 1 μL，72℃保温 2 min 后，冰上速冷 2 min；然后在终体积为 10 μL 的反应体系中，加入 5×第一链反应缓冲液（250 mmol/L TrisHCl，pH 8.3；375 mmol/L KCl；30 mmol/L $MgCl_2$）2 μL、DTT（20 mmol/L）1 μL、dNTP（10 mmol/L）1 μL 和 PowerScript 逆转录酶 1 μL，42℃保温 1 h。取 2 μL 第一链 cDNA 加入 dNTP 2 μL、PCR 引物 4 μL 和 2 μL 50×Advantage 2 cDNA Polymerase Mix，于 100 μL 反应体系中进行如下 PCR 循环：95℃预变性 1 min 后，以 95℃变性 25 s、65℃复性 25 s、68℃延伸 6 min 反应 14 个循环，72℃延伸 10 min。反应结束后，取 5 μL 产物电泳检测。此 PCR 产物用于构建质粒文库。

1.3 SMART cDNA 质粒文库的筛选及数据分析

将处于卵巢发育起始和性反转后期的斜带石斑鱼垂体 SMART cDNA 分别连接入 pGEM-T 载体（Promega），取连接产物转化 DH5α 感受态细胞。将 SMART cDNA 质粒文库以合适的密度均匀涂布在 Xgal/IPTG LB 琼脂平板上，随机挑取白色菌落接种于 0.5 mL LB 液体培养基中，37℃培养过夜。取 1 μL 菌液，用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 扩增，PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测是否有插入片段，有插入者加甘油保种于 -80℃低温冰箱。选取插入片段在 200 bp 以上的阳性克隆测序（上海联合基因公司）。将所得序列与 GenBank 数据库中的核酸和蛋白质序列进行比对。设定比对参数为 40%的一致性（identity），匹配长度大于 55 个氨基酸且 E 值小于 0.0001 的序列为同源序列。

2 结　果

2.1 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼的垂体 SMART cDNA 的合成

琼脂糖电泳检测总 RNA 的质量，结果表明，28*S* 条带明显亮于 18*S* 条带，同时紫外分光光度计进行定量分析表明，OD_{260} nm/OD_{280} nm = 1.96，说明所提取的 RNA 质量较高，可以用于后续的 cDNA 合成。用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增合成的 SMART cDNA，结果显示，SMART cDNA 的弥散带集中于 0.2—2 kb，并具有富集带（图略），可见合成的 cDNA 质量良好，可以进行 EST 的筛选。

2.2 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体 cDNA 质粒文库 EST 的筛选

将处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体的 SMART cDNA 分别克隆到 pGEM-T 载体中，成功构建了相应的质粒文库。从处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体 cDNA 质粒文库中分别随机挑取了 300 和 310 个插入片段长度大于 200 bp 的阳性克隆进行单向测序。所得序列经 GenBank 检索和生物信息学比较，最终获得了 232 个处于卵巢发育起始阶段垂体的 EST 和 258 个处于性反转后期垂体的 EST。在 232 个卵巢发育起始阶段斜带石斑鱼垂体的 EST 中，未找到同源序列的有 52 个，占总 EST 数的 22.4%；已知序列为 180 个，代表 73 个基因。而在 258 个性反转后期斜带石斑鱼垂体的 EST 中，未找到同源序列的有 49 个，占总 EST 数的 18.9%；已知序列为 209 个，代表 76 个基因。

2.3 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体 cDNA 质粒文库中的功能基因分类

已知功能基因的分类主要按照 Ju et al（2000）进行。在 180 个与 GenBank 中有同源序列的、处于卵巢发育起始阶段斜带石斑鱼垂体的 EST 中，与各种激素同源的序列最多，为 94 个，占总 EST 数（232）的 40.5%；其次是与已报道的，但目前不知功能的蛋白的同源序列，占 11.6%；蛋白翻译机制相关基因占 8.2%；线粒体相关基因占 3.9%；其他基因所占比例较低，分别属于免疫相关、细胞结构、离子通道及蛋白折叠转运、代谢和酶等（表 1）。在 94 个激素 EST 中，生长/催乳激素家族基因占绝大多数，共有 76 个，分别为 21 个 GH、30 个 SL 和 25 个 PRL；其余为 11 个 TSHβ、4 个 POMC 和 3 个 GTHα。处于性反转后期斜带石斑鱼垂体中的激素表达量略有减少（表 1），在 209 个

与GenBank中有同源序列的、处于性反转后期阶段的斜带石斑鱼垂体的EST（258）中，有90个（34.9%）与激素具有较高同源性；其次为与已报道的，但目前不知功能的蛋白的同源序列，占13.6%；线粒体相关基因占6.2%；蛋白翻译机制相关基因占6.2%、转录因子及DNA结合相关基因占5.8%；其他基因分别属于酶、离子通道及蛋白折叠转运、免疫相关、细胞结构和肿瘤相关及肿瘤抑制基因等。在90个激素EST中，GTH的三个亚基被筛选到50次，其中GTHα出现的频次最高，达42次；生长/催乳激素家族基因被筛选到36次，其中PRL出现15次。

2.4 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体激素的差异表达

对处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体EST中各种激素的相对表达丰度进行了比较分析，结果如表2所示：与卵巢发育起始阶段垂体中激素含量相比，在性反转后期的垂体中，生长/

表1 处于卵巢发育起始和性反转后期斜带石斑鱼垂体EST的分类分析

Tab. 1 Summary of the EST analysis of the pituitary of the orange-spotted grouper at the early stage of ovary development and at the late stage of sex inversion

种类 Category	卵巢发育起始石斑鱼垂体EST（232） Early stage of ovary development（232）			性反转后期斜带石斑鱼垂体EST（258） Late stage of sex inversion（258）		
	测序克隆数目 Number of clones sequenced	所占比例 Percentage（%）	基因数目 Number of genes	测序克隆数目 Number of clones sequenced	所占比例 Percentage（%）	基因数目 Number of genes
蛋白翻译机制相关基因 Gene involved in the protein translation machinery	19	8.2	14	16	6.2	11
细胞结构基因 Cellular structural genes	3	1.3	3	4	1.6	4
酶 Enzymes	2	0.9	2	11	3.9	10
转录因子、DNA修复 Transcriptional factors，DNA repair	1	0.4	1	15	5.8	12
免疫相关基因 Genes involved in immune system	13	5.6	2	4	1.6	3
离子通道和蛋白转运基因 Ionic channels proteins and transporters	2	0.9	2	8	3.1	7
肿瘤相关和肿瘤抑制基因 Tumor-related proteins，tumor suppressors	3	1.3	3	4	1.6	4
激素、受体和调节蛋白 Hormones，receptors and regulatory proteins	94	40.5	6	90	34.9	7
线粒体基因 Mitochondrial genes	9	3.9	8	16	6.2	4
未知功能蛋白 Genes homologous to sequences of unknown functions	27	11.6	25	35	13.6	8
其他基因 Other genes	7	3.0	7	6	2.3	6
小计 Subtotal	180	77.6	73	209	81.0	76
在GenBank中无同源序列 Unknown clones	52	22.4	52	49	18.9	49
总计 Total	232	100	125	258	100	125

表2 处于卵巢发育起始阶段和性反转后期斜带石斑鱼垂体EST中激素的差异表达

Tab. 2 Differential expression of hormones in the pituitary EST of the groupers at the early stage of ovary development and at the late stage of sex inversion

种类 Category	处于卵巢发育起始阶段斜带石斑鱼垂体 EST（232） Early stage of ovary development		处于性反转后期斜带石斑鱼垂体 EST（258） Late stage of sex inversion		表达量变化 Change of expression（%）
	克隆数目 Number of clones sequenced	所占比例 Percentage（%）	克隆数目 Number of clones sequenced	所占比例 Precentage（%）	
GH	21	9.0	11	4.3	−52.2
PRL	25	10.8	15	5.8	−46.3
SL	30	12.9	10	3.9	−69.8
GTH α	3	1.3	42	16.3	+11.54
FSHβ	—	—	2	0.8	—
LHβ	—	—	6	2.3	—
TSHβ	11	4.7	0	—	—
POMC	4	1.7	4	1.6	−5.9

催乳激素家族总表达量下降，GH、PRL 和 SL 的表达量分别由 9.0%、10.8% 和 12.9% 下降至 4.3%、5.8% 和 3.9%；POMC 的表达量基本没有变化。GTH 的表达量急剧增加，GTHα 的表达量由 1.3% 上升至 16.3%，FSHβ 和 LHβ 的表达量分别上升至 0.8% 和 2.3%。

3　讨　论

在本研究中，我们利用 EST 技术分析了处于卵巢发育起始阶段和性反转后期斜带石斑鱼垂体中基因的表达情况。在卵巢发育起始阶段和性反转后期斜带石斑鱼垂体的 EST 中，未找到同源序列的分别有 52 个和 49 个，仅占总 EST 数的 22.4% 和 18.9%，大大低于鱼类中已报道的 EST 分析。例如，在斜带石斑鱼下丘脑的 EST 中，无同源序列的 EST 占总 EST 数的 60%（Zhou et al，2006）；在真赤鲷脾的 EST 中，无同源序列的 EST 占 84.1%（Chen et al，2004）；在罗非鱼卵巢的 EST 中，无同源序列的 EST 占 51.7%（Chu et al，2006）；在沟鲶脑的 EST 中，无同源序列的 EST 占 50.5%（Ju et al，2000）。Karsi et al（1998）在人工诱导排卵后的沟鲶垂体 EST 分析中，发现无同源序列的 EST 占总 EST 的 41%，认为垂体 EST 中未知序列所占比例较低可能是由于垂体是一个主要由内分泌细胞组成的高度特化的器官，其主要功能是产生激素和其他调节因子。在本研究中分析的两个 cDNA 质粒文库中，被大量筛选到的是各种激素（分别占总 ESTs 的 40.5% 和 34.9%），这表明在卵巢发育起始阶段和性反转后期，斜带石斑鱼垂体中激素分泌功能活跃。另一方面，由于近年来有大量基因数据被报道，在 GenBank 中搜索不到同源序列的 EST 越来越少。

在卵巢发育起始阶段和性反转后期斜带石斑鱼垂体 cDNA 质粒文库中各种激素的表达量存在巨大差异。生长/催乳激素家族被认为是由同一个基因进化而来的（Chen et al，1994），有相似的结构，通过诱导合成类胰岛素样生长因子（IGF）调控鱼类多种生理活动，例如 PRL 不但调控水、离子平衡，生长和发育，而且在代谢、行为、繁殖和免疫调节中起作用（Manzon，2002）。在卵巢发育起始阶段斜带石斑鱼生长/催乳激素家族基因占总激素表达量的 80.8%，GH、SL 和 PRL 这三个家族成员所占比例基本相似，分别为 22.3%、26.6% 和 31.9%，它们可能起相同或互补的作用。在性反转后期斜带石斑鱼垂体中，生长/催乳激素家族基因总表达量下降，仅占总激素的 40%，并且这三个家族成员的表达有差异，SL 的表达下降了 69.8%，而 GH 和 PRL 下降较少（分别下降了 52.2% 和 46.3%）。

鱼类存在两种 GTH：FSH 和 LH，其中 FSH 促进卵泡成熟和维持足细胞的功能，LH 调控性腺中性类固醇激素的分泌。在性反转后期，石斑鱼垂体中的 GTH 表达量急剧增加，占激素总表达量的 55.6%，其中 GTHα 的表达量几乎占总激素的一半（46.7%），FSHβ 和 LHβ 分别占 2.2% 和 6.7%，LHβ 的表达量约为 FSHβ 的三倍。GTH 的表达急剧上升表明，它可能在石斑鱼性反转过程中起重要作用；LH 的表达显著高于 FSH，暗示 LH 和 FSH 可能起不同作用，但这两种激素的具体功能及其作用方式有待于进一步研究。

POMC 是促肾上腺皮质激素（ACTH）、促黑色素（MSH）和 β-内啡肽（β-END）的共同前体，这三种由 POMC 产生的激素参与压力应答及环境适应相关的多种生理功能。Karsi et al（1998）认为 POMC 在人工诱导排卵期的表达与此时 GTHβ 表达剧烈升高相关。POMC 在性反转后期斜带石斑鱼垂体中的表达水平与处于卵巢起始阶段的石斑鱼垂体中的表达基本相同，同时 GTHβ 表达水平升高，这暗示在斜带石斑鱼性反转过程中 POMC 与 GTH 可能共同起作用。

参考文献：

Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone [J]. *Endocr Rev*, **4**: 179–211.

Chen R, Li W, Lin H. 2005. cDNA cloning and mRNA expression of neuropeptide Y in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **142**(1): 79–89.

Chen SL, Xu MY, Hu SN, Li L. 2004. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen [J]. *Aquaculture*, **240**(2): 115–130.

Chen TT, Marsh A, Shamblott M, Chan KM, Tang YL, Cheng CM, Yang BY. 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin: Like growth factor genes [A]. In: Sherwood NM, Hew CL. Fish Physiology [M]. New York: Academic Press, 179–

209.

Chu SL, Weng CF, Hsiao CD, Hwang PP, Chen YC, Ho JM, Lee SJ. 2006. Profile analysis of expressed sequence tags derived from the ovary of tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Aquaculture*, **251** (4): 537-548.

Cui M, Li W, Liu W, Yang K, Pang Y, Lin H. 2007. Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) luteinizing hormone in insect cells by the baculovirus expression system and its biological effect [J]. *Biol Rep*, **76** (1): 74-84.

Davey GC, Caplice NC, Martin SA, Powell R. 2001. A survey of genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags [J]. *Gene*, **263**: 121-130.

Douglas SE, Gallant JW, Bullerwell CE, Wolff C, Munholland J, Reith ME, 1999. Winter flounder expressed sequence tags: Establishment of an EST database and identification of novel fish genes [J]. *Mar Biotechnol*, **1**: 458-464.

Fan YQ, Lin QM, Qi X, Hong GY. 1992. Effects of 17α methyltestosterone on sex reveal in *Epinephelus akaara* [J]. *Fish Sci*, **16**: 171-174. [方永强，林秋明，齐 襄，洪桂英. 1992. 17α-甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. 水产学报，**16**: 171-174.]

Gong Z. 1999. Zebrafish expressed sequence tags and their applications [J]. *Methods Cell Biol*, **60**: 213-233.

He C, Chen L, Simmons M, Li P, Kim S, Liu ZJ. 2003. Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis [J]. *Anim Genet*, **34**: 445-448.

Hirono I, Aoki T. 1997. Expressed sequence tags of medaka (*Oryzias latipes*) liver mRNA [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, **6**: 345-350.

Inoue S, Nam BH, Hirono I, Aoki T. 1997. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, **6**: 376-380.

Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoub M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, de Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechav M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Crollius HR. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype [J]. *Nature*, **431**: 946-957.

Ji GD, Zhou L, Wang Y, Xia W, Gui JF. 2006a. Identification of a novel C2 domain factor in ovaries of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **143**: 374-383.

Ji GD, Li MY, Zhou L, Gui JF. 2006b. Screening and analysis of differential expression genes in blastula and tail bud stage embryos in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Zool Res*, **27**: 461-472. [汲广东，李名友，周 莉，桂建芳. 2006. 斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的筛选及克隆. 动物学研究，**27**: 461-472.]

Jia HB, Zhou L, Shi YH, Gui JF. 2004a. Molecular cloning and evolutionary implications of growth hormone/prolactin family gene cDNAs in grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Zool Res*, **25** (3): 242-248. [贾海波，周 莉，石耀华，桂建芳. 2004a. 斜带石斑鱼生长激素/催乳素家族基因 cDNAs 的分子克隆及其进化意义. 动物学研究，**25** (3): 242-248.]

Jia HB, Zhou L, Wang Y, Li CJ, Gui JF. 2004b. cDNA cloning, expression and localization of somatolactin by immunofluorescence histochemistry method in grouper *Epinephelus oioides* [J]. *High Technol Lett*, **14**: 76-82. [贾海波，周 莉，汪 洋，李创举，桂建芳. 2004b. 斜带石斑鱼生长催乳素基因全长 cDNA 的克隆、表达及其免疫荧光组化分析. 高技术通讯，**14**: 76-82.]

Ju Z, Karsi A, Kocabas A, Patterson A, Cao P, Li D, Dunham R, Liu Z. 2000. Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Genes and expression profile from the brain [J]. *Gene*, **261**: 373-382.

Karsi A, Li P, Dunham RA, Liu ZJ. 1998. Transcriptional activities in the pituitaries of channel catfish before and after induced ovulation by injection of carp pituitary extract as revealed by expressed sequence tag analysis [J]. *J Mol Endocrinol*, **21**: 121-129.

Karsi A, Cao D, Li P, Patterson A, Kocabas A, Feng J, Ju Z, Mickett KD, Liu Z. 2002. Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin [J]. *Gene*, **285**: 157-168.

Kim S, Karsi A, Dunham RA, Liu ZJ. 2000. The skeletal muscle α-actin gene of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and its association with piscine specific SINE elements [J]. *Gene*, **252**: 173-181.

Ko CF, Chiou TT, Chen TT, Wu JL, Chen JC, Lu JK. 2007. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Mar Biotechnol* (NY), **13**: 20-32.

Kocabas MA, Li P, Cao D, Karsi A, He C, Patterson A. 2002. Expression profile of the channel catfish spleen: Analysis of genes involved in immune functions [J]. *Mar Biotechnol*, **4**: 526-536.

Kono K, Ponpornpisit A, Sakai M. 2004. The analysis of expressed genes in head kidney of common carp *Cyprinus carpio* L. stimulated with peptidoglycan [J]. *Aquaculture*, **235** (1): 37-52.

Lee STL, Kime DE, Lam TJ, Tan CH. 1998. Synthesis of 17, 20 α/β-dihydroxy-4-pregnen-3-one and 5 β-pregnanes in spermatozoa of primary and 17 α-methyltestosterone-induced secondary male grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **112**: 1-9.

Li CJ, Zhou L, Wang Y, Hong YH, Gui JF. 2005. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α, FSHβ and LHβ in groupers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **233**: 33-46.

Li WS, Chen D, Wong AO, Lin HR. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **144** (1): 78-89.

Lin HR. 2003. The sustainable exploitation of marine fish resources and the research directions of science and technology for marine fish [J]. *Eng Sci*, **5** (3): 27-30. [林浩然. 2003. 海洋鱼类资源的可持续利用和海洋鱼类科学技术的研究方向. 中国工程科学，**5** (3): 27-30.]

Liu ZJ, Karsi A, Dunham RA. 1999. Development of polymorphic EST markers suitable for genetic linkage mapping of catfish [J]. *Mar Biotechnol*, **1**: 437-447.

Liu ZJ, Li P, Kocabas A Ju Z, Karsi A, Cao D, Patterson A. 2001. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: Evidence of trinucleatide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**: 317-324.

Manzon LA. 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: A review [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **125**: 291-300.

Martin SA, Caplice NC, Davey GC, Powell R. 2002. EST-based identification of genes expressed in the liver of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**: 578-585.

Pedroso FL, de Jesus-Ayson EG, Cortado HH, Hyodo S, Ayson FG. 2006. Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **145** (3): 237-46.

Rudd S. 2003. Expressed sequence tags: Alternative of complement to whole genome sequences [J]. *Trends Plant Sci*, **8**: 321-329.

Sarropoulou E, Power DM, Magoulas A, Geisler R, Kotoulas G. 2005.

Comparative analysis and characterization of expressed sequence tags in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) liver and embryos [J]. *Aquaculture*, **243** (1): 69–81.

Shiue YL, Wang LH, Chao TY, Lin CH, Tsai CL. 2004. EST based identification of genes expressed in the hypothalamus of adult tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**: 523–527.

Wang Y, Zhou L, Yao B, Li CJ, Gui JF. 2004. Differential expression of thyroid-stimulating hormone β subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **220**: 77–88.

Xia W, Zhou L, Yao B, Li CJ, Gui JF. 2007. Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **263**: 156–172.

Xiao D, Lin HR. 1999. The regulation of growth through the brain-pituitary-liver axis in fish [J]. *Fish Sci Tech Inform*, **26**: 99–102. [肖东，林浩然. 1999. 利用脑 – 脑垂体 – 肝脏轴调控鱼类生长. 水产科技情报，**26**：99–102.]

Xie J, Wen JJ, Chen B. 2001. Differential gene expression in fully grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, **271**: 109–116.

Yao B, Zhou L, Gui JF. 2003. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *sox*3 gene in grouper *Epinephelus coioides* [J]. *High Technol Lett*, **13** (5): 74–81. [姚 波，周 莉，桂建芳. 2003. 斜带石斑鱼 *sox*3 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯，**13** (5)：74–81.]

Yao B, Zhou L, Wang Y, Xia W, Gui JF. 2007. Differential expression and dynamic changes of *SOX3* during gametogenesis and sex inversion in protogynous hermaphroditic fish [J]. *J Exp Zool*, **307** (4): 207–219.

Yeh SL, Kuob CM, Tingc YY, Changa CF. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Aquaculture*, **218** (4): 729–739.

Ye X, Li WS, Lin HR. 2005. Polygenic expression of eomatostatin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): Molecular cloning and distribution of the mRNAs encoding three somatostatin precursors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **241**: 62–72.

Zhang Y, Zhang W, Zhang L, Zhu T, Tian J, Li X, Lin H. 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **92** (1–2): 39–50.

Zhang W, Zhang Y, Zhang L, Zhao H, Li X, Huang H, Lin H. 2007. The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β-subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus Coioides*) during 17α-methyltestosterone-induced precocious sex change [J]. *Mol Rep Dev*, **74** (6): 665–673.

Zhou L, Wang Y, Yao B, Li CJ, Ji GD, Gui JF. 2005. Molecular cloning and expression pattern of 14 kDa apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **142**: 432–437.

Zhou L, Yao B, Xia W, Li CJ, Wang Y, Shi YH, Gui JF. 2006. EST-based identification of genes expressed in the hypothalamus of male orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Aquaculture*, **256** (2): 129–139.